

日本国特許庁
JAPAN PATENT OFFICE

30.7.2004

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されて
いる事項と同一であることを証明する。

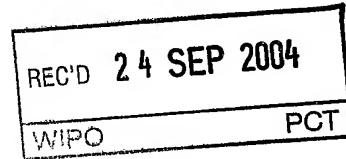
This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed
with this Office.

出願年月日
Date of Application: 2004年 3月 3日

出願番号
Application Number: 特願2004-058336

[ST. 10/C]: [JP2004-058336]

出願人
Applicant(s): 独立行政法人 科学技術振興機構



PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

2004年 9月10日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

小川

洋

【書類名】 特許願
【整理番号】 AB04009J
【特記事項】 特許法第30条第1項の規定の適用を受けようとする特許出願
【あて先】 特許庁長官殿
【発明者】
 【住所又は居所】 神奈川県相模原市相模大野 4-2-5-505
 【氏名】 丸山 厚
【特許出願人】
 【識別番号】 503360115
 【氏名又は名称】 独立行政法人 科学技術振興機構
【代理人】
 【識別番号】 100100181
 【弁理士】
 【氏名又は名称】 阿部 正博
【手数料の表示】
 【予納台帳番号】 053419
 【納付金額】 21,000円
【提出物件の目録】
 【物件名】 特許請求の範囲 1
 【物件名】 明細書 1
 【物件名】 図面 1
 【物件名】 要約書 1
 【包括委任状番号】 0316565

【書類名】特許請求の範囲**【請求項 1】**

グアニジノ基を含む主鎖と、親水性官能基からなるカチオン性高分子を有効成分とする、二重鎖DNA又はRNAにおける特定部位のヌクレオチド配列の該配列に相同的のヌクレオチド配列による交換反応を促進するための調製物。

【請求項 2】

グアニジノ基がアルギニンに由来する、請求項1記載の調製物。

【請求項 3】

カチオン性高分子の主鎖が、一級アミノ基または二級アミノ基を持つ高分子をグアニジル化したものに由来する部分から成る、請求項1又は2記載の調製物。

【請求項 4】

カチオン性高分子の主鎖中でグアニジル基を持つ残基の割合が0.3~1である、請求項3記載の調製物。

【請求項 5】

ポリアルギニン及びポリリジンの各ブロック中に含まれるアルギニン残基及びリジン残基の数が10~5,000の範囲である、請求項1~4のいずれか一項に記載の調製物。

【請求項 6】

カチオン性高分子の側鎖に親水性官能基を持つ、請求項1~5のいずれか一項に記載の調製物。

【請求項 7】

親水性官能基がポリエチレングリコール、デキストラン、又はヘキサマルトースから選択される親水性高分子である、請求項1~6のいずれか一項に記載の調製物。

【請求項 8】

親水性高分子が、カチオン性高分子の一級アミノ基または二級アミノ基とグラフト型で結合している、請求項1~7のいずれか一項に記載の調製物。

【請求項 9】

フリー塩としての分子量が2,000~200,000である、請求項6~8のいずれか一項に記載の調製物。

【請求項 10】

親水性高分子に由来するグラフト型側鎖の含量が30~90重量%である、請求項6~9のいずれか一項に記載の調製物。

【請求項 11】

グラフト比率が5~40%の範囲である、請求項6~10のいずれか一項に記載の調製物。

【請求項 12】

交換反応が、蛍光 in situハイブリダイゼーション(FISH)、ポリメラーゼ連鎖反応、逆転写PCR(RT-PCR) またはDNAチップと標的の二重鎖構造を有するDNAとのハイブリダイゼーションに際して生じるものである請求項1~11のいずれか一項に記載の調製物。

【請求項 13】

交換反応が、二重鎖構造を有するRNA鎖における特定のヌクレオチド配列のアンチセンスDNAもしくはRNA及びリボザイムから選ばれる单鎖配列による交換が生じるものである請求項1~11のいずれか一項に記載の調製物。

【請求項 14】

交換反応が、二重鎖構造を有するDNA鎖における特定のヌクレオチド配列と該配列に相同的のヌクレオチド配列とによって生じることにより、遺伝子の発現及び複製を調製するものである請求項1~11のいずれか一項に記載の調製物。

【書類名】明細書

【発明の名称】ヌクレオチド鎖交換反応促進物

【技術分野】

【0001】

本発明は、二重鎖DNAあるいはRNAの操作の際に使用するためのカチオン性高分子の調製物に関する。より具体的には、二重鎖DNA鎖あるいはRNA鎖における特定部位のヌクレオチド配列を相補的なヌクレオチド配列（もう一方のDNAあるいはRNA鎖の対応部位に対しては相補配列である。）で交換する際に用いるカチオン性高分子の調製物に関する。

【背景技術】

【0002】

様々なタイプの核酸作用タンパク質 (nucleic acid-acting proteins) が生体内において核酸ハイブリッドの構造的転移の調節に関与している。

【0003】

レトロウイルスのヌクレオキアプシド (NC) タンパク質はDNA鎖を一つのハイブリッドからより安定なハイブリッドに転移することによって、ウイルス感染における幾つかの役割を担っている ((a)

Z. Tsuchihashi and P. O. Brown, J. Virol. 68, 5863 (1994). (b) M. Lapadat-Tapolsky, C. Pernelle, C. Borie and J-L. Darlix,

Nucleic Acids Res. 23, 2434 (1995))。NCタンパク質は塩基対の破壊と再会合を刺激する活性を有し、核酸の適切なハイブリダイゼーションを助ける核酸シャペロンとして機能している (a)

W. Wu, L. E. Henderson, T. D. Copeland, R. J.

Gorelick, W. J. Bosche, A. Rein and J. G. Levin, J. Virol. 70, 7132

(1996). (b) X. Ji,

G. J. Klarmann and B. D. Preston, Biochemistry 35, 132 (1996). (c) V. Tanchou, C. Gabus,

V. Rogemond and J-L. Darlix, J. Mol. Biol. 252, 563 (1995))。

【0004】

RecAタンパク質はDNAに対する多価の結合部位を有し、二重鎖DNA (dsDNA) 及び一本鎖DNA (ssDNA) の双方との中間複合体を形成する (a)

J. W. Roberts, C. W. Roberts, N. L. Craig and E. M. Phizicky, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 43, 917 (1979). (b) T. Shibata, C. DasGupta, R. P. Cunningham and C. M. Radding, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76, 1638 (1979).

(c) K. McEntee, G. M. Weinstock and I. R. Lehman, Proc.

Natl. Acad. Sci. USA 76, 2615 (1979). (d) E. Cassuto, S. C.

West, J. Mursalim, S. Conlon

and P. Howard-Flanders, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 3962 (1980)).

【0005】

核酸分子の配列特異性及びその集合特性は充分に研究されているので、それらを分子レベルで任意の構造を持つ分子構築の為に利用することが出来る。DNA分子マシン ((a) B. Yurke, A. J. Turberfield, A. P. Mills Jr., F. C. Simmel and J. L. Neumann, Nature 406, 605 (2000). (b) H. Yan, X. Zhang, Z. Shen and N. C. Seeman, Nature 415, 62 (2002)) .、ナノアセンブリ ((a) B. Liu, N. B. Leontis and N. C. Seeman, Nanobiology 3, 177 (1994).

(b) E. Winfree, F. Liu,

L. A. Wenzler and N. C. Seeman, Nature 394, 539

(1998)) .、及び分子コンピューター ((a) L. M. Adleman, Science 266, 1021 (1994).

(b) K. Sakamoto, H. Gouzu, K. Komiya, D. Kiga, S. Yokoyama, T. Yokomori and M. Hagiya, Science 288, 1223 (2000).) 等が提案されている。従って、核酸分子の構造的転移を操作することのできる人工的な物質は、バイオテクノロジー領域のみならず、ナノテクノロジー領域においても有益なツールとなり得るものである。

【0006】

本発明者らは、カチオン性ポリ(L-リジン)(PLL)骨格を及びデキストリンの水溶性側鎖から成るカチオン性くし型コポリマー(Cationic comb-type copolymers: CCCs)とDNAとの相互作用について報告してきた(A. Maruyama, M. Katoh, T. Ishihara and T. Akaike, Bioconjugate Chem. 8, 3 (1997) 及びA. Maruyama, H. Watanabe, A. Ferdous, M. Katoh, T. Ishihara and T. Akaike, Bioconjugate Chem. 9, 292 (1998))。グラフト化が高いくし型コポリマーはDNAハイブリダーゼーションを促進させ(H. Torigoe, A. Ferdous, H. Watanabe, T. Akaike and A. Maruyama, J. Biol. Chem. 274, 6161 (1999) 及びA. Ferdous, T. Akaike and A. Maruyama, Bioconjugate Chem. 11, 520 (2000))、DNAの二重鎖及び三重鎖を安定化させる。更に、CCCsは、dsDNAとその相同意的なssDNAとの間のDNA鎖交換反応を刺激し、その速度をスペルミン及びN,N,N-トリメチルヘキサデシルアンモニウムプロマイド(セチルトリメチルアンモニウムプロマイド:CTAB)よりも増大させる(37°Cにおいて50,000倍)ことが判明した(W. J. Kim, T. Ishihara, T. Akaike and A. Maruyama, Chem. Eur. J. 7, 176 (2001))。このコポリマーは、核酸シャペロン活性を示し、核酸分析に有効であることが示された。

【0007】

核酸作用タンパク質には、塩基性アミノ酸、即ち、リジン及びアルギニンから成る一つ又はそれ以上のクラスターが共通している。しかしながら、これらクラスター中の塩基性アミノ酸の組成は不規則であり、各タンパク質間で大きく異なっている。例えば、ヒストンタンパク質はかなり多量のリジン及びアルギニン残基が含まれているが、プロタミンにはリジン残基は殆ど含まれていない(H. Busch, in: Histones and Other Nuclear Proteins, p. 28, Academic Press., New York (1965))。これらのことから、リジン及びアルギニンは異なる機構で核酸と相互作用することが示唆される。塩基性官能基として、リジンは第一アミノ基を有し、アルギニンはグアニジノ基を有する。

【0008】

生理的pHにおいて、第一アミノ基及びグアニジノ基は正電荷を有している。リジン又はアルギニン含有量が多いペプチドは、生理的pHにおいてDNAと主にイオン的作用によって相互作用するが、アルギニン含有量が多いペプチドとDNA又はRNAとの相互作用には、より強い水素結合が関与していることが報告されている(F. A. Cotton, V. W. Day, E. E. Hazen Jr. and S. Larsen, J. Am. Chem. Soc. 95, 4834 (1973)、G. Lancelot, R. Mayer and C. Helene, Biochim. Biophys. Acta 564, 181 (1979) 及びK. M. Weeks, C. Ampe, S. C. Schultz, T. A. Steitz and D. M. Crothers, Science 249, 1281 (1990))。

【0009】

【特許文献1】特開2001-78769号公報

【非特許文献1】A. Ferdous, T. Akaike and A. Maruyama, Bioconjugate Chem. 11, 520 (2000)

【非特許文献2】W. J. Kim, T. Ishihara, T. Akaike and A. Maruyama, Chem. Eur. J. 7, 176 (2001)

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0010】

上記の通り、本発明者は、既に、二重鎖と相補的単鎖とのスクレオチド鎖交換反応を促進することが出来る物質として、カチオン性重合体を提供したが、更なる解析速度の向上を計り、種々の核酸バイオテクノロジーおよびナノテクノロジーへ応用するには、より高い促進活性を有する物質の開発が望まれている。

【0011】

本発明者は、かかる課題を解決すべく、従来のコポリマーの機能を基礎的に解析し、より高い促進活性を有する物質を開発することに成功し、本発明を完成した。

【課題を解決するための手段】**【0012】**

即ち、本発明は、グアニジノ基を含む主鎖と、親水性官能基からなるカチオン性高分子を有効成分とする、二重鎖DNA又はRNAにおける特定部位のスクレオチド配列の該配列に相同的スクレオチド配列による交換反応を促進するための調製物に係るものである。

【発明の効果】**【0013】**

従来のコポリマーに比べて、数十倍～数百倍の交換反応促進活性を有する物質を提供することが出来た。その結果、従来に比べ、より低温及び／又は高速にスクレオチド鎖交換を行うことができるようになった。

【0014】

二重鎖DNAあるいはRNAとは、相補的な塩基（またはスクレオチド）対、例えば、DNAでは、アデニン（A）とチミン（T）及びグアニン（G）とシトシン（C）、RNAでは、Aとウラシル（U）およびGとCとの対合により形成されるDNA間で、あるいはRNA間で形成された高次構造を保ちうる鎖を意味する。本発明において、このようなDNAあるいはRNAは生体成分から単離されたものであっても、また単離されることなく、生体組織片中に存在するものであってもよい。更に、合成された二重鎖DNAあるいはRNAも包含される。

【0015】

このようなDNAあるいはRNAにおける特定部位のスクレオチド配列とは、直鎖状になったDNAあるいはRNAの末端部位あるいは中間部位等のいかなる部位のスクレオチド配列であってもよい。また、該配列に相同的スクレオチド配列とは、配列を構成する塩基が実質的に同一であることを意味する。実質的に同一とは、上記特定部位のスクレオチド配列とそれに対する相同配列はA、T、G及びCのそれぞれが少なくとも90%、好ましくは95%は連続する配列順において同一であるか、あるいはそのような配列においてTがUに置き代えられている場合をいう。

【0016】

従って、交換反応は、相補的な二本の鎖からなる二重鎖DNAまたはRNAが、二本の鎖のうちの一本の鎖における特定部位のスクレオチド配列がそれに相同的スクレオチド配列を有する単鎖DNAまたはRNAにより交換されることを意味する。具体的な交換の様式としては、二重鎖DNAの特定部位のスクレオチド配列が単鎖DNAあるいはRNAにおける相同的スクレオチド配列により交換されるか、あるいは二重鎖RNAの特定部位のスクレオチド配列が単鎖DNAあるいはRNAにおける相同的スクレオチド配列により交換される場合が挙げられる。

【0017】

単鎖DNAあるいはRNAにおける相同的スクレオチド配列は、該単鎖DNAあるいはRNA分子全体を占めるものであっても、一部分を占めるものであってもよい。

【0018】

交換あるいは交換反応とは、二重鎖DNAあるいはRNAの特定部位のスクレオチド配列が、該配列に相同的単鎖DNAあるいはRNAにスクレオチド配列により単に入れ替わり再構成されることを意味し、生來の特定部位のスクレオチド配列の切斷除を伴うものでない。

【発明を実施するための最良の形態】

【0019】

本発明のカチオン性高分子を構成する主鎖中のグアニジノ基は当業者に公知の任意の構造を有することができるが、特に、アミノ酸の一種であるアルギニンに由来するものが好適である。更に、主鎖中には、リジンに由来する部分を含むものが好ましい。

従って、一好適具体例として、カチオン性高分子の主鎖が、一級アミノ基または二級アミノ基を持つ高分子をグアニジル化したものに由来する部分から成るカチオン性高分子を挙げることが出来る。

ここで、カチオン性高分子の主鎖中でグアニジル基を持つ残基の割合は当業者が使用目的などに応じて当業者が適宜選択することが出来、好ましくは、0.3～1である。即ち、カチオン性高分子の主鎖中のアルギニン残基及びリジン残基の割合は、好ましくは、1対0～0.1対0.9、より好ましくは、1対0～0.3対0.7とすることが可能である。更に、各ポリアルギニン及びポリリジンブロック中に含まれるアルギニン残基及びリジン残基の数も当業者が適宜選択することが出来るが、通常、10～5,000の範囲である。

【0020】

本発明のカチオン性高分子は、好ましくは、側鎖に親水性官能基を持つ。かかる親水性官能基は、当業者に公知の任意のものとすることが出来る。その例として、ポリエチレングリコール等の水溶性ポリアルキレングリコール、デキストラン、マルトヘキサオース、ブルラン、アミロース、アラビノガラクタン等の水溶性多糖、セリン、アスパラギン、グルタミン、スレオニン等の親水性アミノ酸を含む水溶性ポリアミノ酸、アクリルアミド及びその誘導体をモノマーとして用い合成される水溶性高分子、メタクリル酸及びアクリル酸並びにその誘導体（例、ヒドロキシエチルメタクリレート）をモノマーとして用い合成される水溶性高分子、ポリビニルアルコール及びその誘導体からなる群より選ばれる1種以上の水溶性高分子により形成されるものを挙げることができる。

【0021】

親水性高分子のような親水性官能基から成る側鎖は、当業者に公知の任意の方法により、カチオン性高分子の主鎖中の適当な部位、例えば、カチオン性高分子の一級アミノ基または二級アミノ基とグラフト型で結合している。

【0022】

更に、このようなカチオン性高分子の分子量、また、側鎖修飾基それ自体の鎖長及びグラフトの程度は、具体的な使用目的により最適な値が変動するので限定できないが、当業者であれば、後述の実施例を参照に各最適値を選択することができるであろう。

例えば、フリー塩としての分子量は2,000～200,000、親水性高分子に由来するグラフト型側鎖の含量は30～90重量%、グラフト比率は5～40%の範囲とすることが出来る。

【0023】

本発明に従えば、上記カチオン性高分子を有効成分とする調製物が提供されるが、かような調製物は、目的とする交換反応に悪影響を及ぼさない限り、合成された高分子の粗製物あるいは精製された高分子と、必要により、緩衝剤、生理食塩水等から構成することができる。また、高分子は1種または2種以上の混合物であってもよい。

【0024】

このようなカチオン性高分子は、本発明に従う交換反応においては、一般的に、交換反応に供される総（単鎖十二重鎖）DNAあるいはRNAにおけるホスフェートに対するカチオン性基の荷電比が0.1以上、好ましくは0.5～1000となるように選ばれる。一方、被交換反応に供される二重鎖DNAあるいはRNAに対する単鎖DNAあるいはRNAのモル比率は約5を超えるように選ぶことが有利である。

【0025】

交換反応は、二重鎖DNAあるいはRNAが熱変性しないような温度下で行うことができ、ATPやMg²⁺などの補助因子を必要とすることなく行うことができる。上記温度は、生物細胞等に悪影響が生じない生理的に許容できる温度、例えば、約5℃～約40℃であることが好ましい。

【0026】

本発明のカチオン性高分子は、上記の条件下で二重鎖DNAあるいはRNAにおける特定部位のヌクレオチド配列を単鎖DNAあるいはRNAの相同的ヌクレオチド配列で効率よく交換できる。オリゴヌクレオチドは、5mer以上であれば理論上いかなる鎖長のものでもよい。なお、好ましくは10mer以上500mer以下の配列に本発明は適用できる。したがって、本発明のカチオン性高分子の調製物は、例えば、二重鎖DNAやRNAに対するプライマーやプローブまたは、それ自体既知の標識や医薬等を担持するオリゴヌクレオチドのハイブリダイゼーション、次いで二重鎖DNAあるいはRNAの特定部位にハイブリダイズしたプライマーやプローブまたはオリゴヌクレオチドの機能を利用するPCR及びRT-PCRプロセスやDNAチップを用いるプロセス、蛍光in situハイブリダイゼーションを利用する核酸分析において有用である。

【0027】

また、二重鎖構造を持つmRNA上へ特定の部位に対し、その相補的配列を含むアンチセンスオリゴヌクレオチド、リボザイム、デオキシリボザイム、三重鎖形成用オリゴヌクレオチドとの交換を促進し、これらオリゴヌクレオチドの遺伝子制御機能を向上させる上でも本発明によるカチオン性高分子は有用である。さらに、ゲノムDNA二重鎖上の特定の部位との相補的ヌクレオチド鎖の交換を生じさせることにより、(DNA結合性タンパク質の結合を調整し)複写および転写課程を制御する上でも有用である。

【実施例】

【0028】

以下、実施例に則して本発明を具体的に説明するが、本発明の技術的範囲はこれらの記載によって何等制限されるものではない。

【0029】

ポリ(L-リジン)(PLL、Mn=27,600)はナカライトスク社(京都(日本))から購入した。デキストランT-10(Dex、Mn=8,700)はファルマシア・バイオテク(ウプサラ(スウェーデン))から購入した。グアニジン化(guanidination)試薬である1-グアニル-3、5-ジメチルピラゾール硝酸エステル(GDMP)はシグマ・オールドリッヂ(セントルイス(アメリカ))から購入した。HPLC精製グレードのオリゴヌクレオチド(ODN)はファスマック(FASMAC)株式会社(神奈川(日本))より購入し、その純度は逆相HPLCによってチェックした。

【0030】

ポリ(L-リジン)一グラフト-デキストラン(PLL-g-Dex)くし型共重合体の調製

PLLg-デキセドリン樹タイプ共重合体の調製は、A. Maruyama, M. Katoh, T. Ishihara and T. Akaike, Bioconjugate

Chem. 8, 3 (1997)、及びA. Maruyama, H. Watanabe, A. Ferdous, M. Katoh, T. Ishihara and T. Akaike, Bioconjugate Chem. 9, 292 (1998)に詳述された方法で実施した。

【0031】

即ち、共重合体は、ホウ酸塩緩衝液中のDexによるPLL-HBrの還元アミノ化反応によって調製され、ザルトリウス限外ろ過装置(MWCO 20 000、Sartorius AG、Goettingen(ドイツ))を使用した限外ろ過によって精製された。得られた共重合体は最終的に凍結乾燥され、SEC-MALSおよび¹H NMRによってその分子量を測定した(フリー塩としてのMn=95,000及びDex含量は=82.9重量%、グラフト比率Dex=7.4%)。

【0032】

PLL-g-Dexくし型共重合体のグアニジン化

PLL-g-Dexのグアニジン化を以下のスキーム1に示す。PLL-g-Dex(10mg、13.3μmol(第一アミノ基)及びGDMP(13.4mg、66.6μmol)は、各400μlに溶解した。各溶液をD2Oの中の5MのNaOHでpH 9.5に調節した(第一アミノ基の最終濃度:13 mM、及びGDMPの最終濃度:67 mM)。溶液を混合し、次に、NMR試供用チューブに入れた。PLL-g-Dexのグアニジン化の時間的経過変化を評価するために、反応をNMR分光計中の37°Cで実施し(96時間)、その間に、¹H-NMR

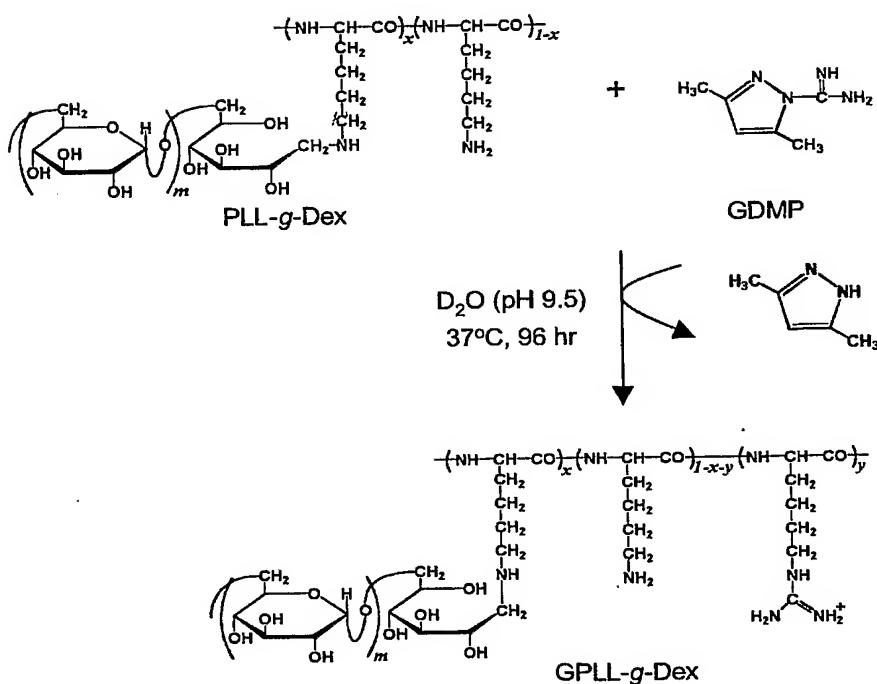
スペクトルの時間経緯による変化が記録された（図1）。

【0033】

ϵ -メチレンプロトンのピーク（3.2-2.7 ppm 領域）がグアニジン化によりシフトすることが期待された。図1から明らかなように、反応の進行に伴い、2.8 ppmにおける ϵ -メチレンプロトンのピークが減少し、グアニジン化リジン部位の ϵ -メチレンプロトンのピークに対応する3.2 ppmにおける ϵ -メチレンプロトンのピークが徐々に増大した。最終的には ϵ -メチレンプロトンのピークは消滅した。これは、第一アミノ基は96時間の反応により、完全にグアノジン基に置換されたことを示している。得られた共重合体は、MWCO 25 000(Spectrum Lab., Rancho Dominguez, USA)のSpectra/Por7膜を使用して、Milli-Q水に対する透析によって分離し、反応しないGDMPを除去した。その後の凍結乾燥によりグアニジン化されたPLL-g-Dex (GPLL-g-Dex)が得られた(84.3%の収率)。図2は、精製後に得られた共重合体の ^{13}C NMRスペクトルを示す。156.6 ppmの新しいピーク(g')の出現は、グアノジノ基が共重合体に組み入れられることを明白に示している。更に、 $^1\text{H-NMR}$ と $^{13}\text{C-NMR}$ スペクトルに予期しない変化が観察されなかったことから、グアニジン化反応中の副反応は無視できることを意味している。

【0034】

【化1】



【0035】

得られた共重合体は、 D_2O (99.95%D; Merk Darmstadt, Germany)に溶解された。 $^1\text{H-NMR}$ スペクトル(270MHz)は 25°C 又は 37°C のプローブ温度でJEOL JNM-EX270分光計(JEOL株式会社、東京(日本))を用いて得られた。化学シフトは、3-トリメチルシリルプロピオネーテッドナトリウム-2,2,3,3-d4 (TSP) を外部対照として使用するppmとして表現される。グアニジン転化は、PLLの ϵ -メチレンプロトンのピーク面積から計算した。GPLL-g-Dexの精製の後、 $^{13}\text{C-NMR}$ スペクトル(125MHz)は、外部対照としてTSPを使用して、 25°C でJEOL

JNM-GX500分光計(JEOL株式会社、東京(日本))で測定した。

【0036】

サイズ排除クロマトグラフィー多重角度光散乱(Sec-MALS)

得られた共重合体は、多重角度光散乱(MALS)検知器(Dawn-EOS、Wyatt Technology, Santa Barbara (CA))及び示差屈折率(RI)検知に接続されたShodex OHpak SB-804及び806Mカラムの上でサイズ排除クロマトグラフィー(SEC)システム(Jasco model 800、東京(日本))を使用して分析された。0.5M酢酸及び0.2M Na₂SO₄の水溶液は、25°Cの0.8 mL/minで移動相として使用された。グラフト共重合体溶液(10mg/mL)のアリクオート(100 μL)がカラムに注入された。数平均分子量(Mn)および重量平均分子量(Mv)は、Windows (商標) Ver4.90 用のAstra (Wyatt Technology)に使用して、RIとMALS信号から計算された。dn/dcの値は、カラムからの試料の回収が100%と仮定して決定された。

【0037】

GPLL-g-Dex と PLL-g-Dex の Sec-MALS による測定結果は図3に示されている。MALS(図3b)によって測定された分子量およびその分布にはほとんど変更はなかった。共重合体におけるPLL含量はわずか17.1重量%であるので、理論上、PLL-g-Dexのグアニジン化によって、共重合体の分子量は5%の増加する。従って、共重合体のグアニジン化が分子量の変化によってほとんど検知されなかったことは合理的である。他方で、図3 b は、グアニジン化において、有意な断片化(fragmentation)がPLL又はDex鎖になかったことを明白に示している。

【0038】

しかしながら、GPLL-g-Dexの溶出はグアニジン化(図3a)によってわずかに遅れた(図3a)。溶出が遅れたのは、共重合体と充填剤の間の共重合体のコンフォメーション又は共重合体とカラムパッキングとの相互作用が変化したことが原因かもしれない。

【0039】

37°CのPLL-g-Dex共重合体およびPLLホモポリマー(Mn=27,600)のグアニジン化の時間経緯による変化は、図4の中で示される。PLL及びPLL-g-Dexの双方の変換値は45時間の反応で96%以上に達した。しかしながら、PLLの反応速度はPLL-g-Dexより高かった。GDMPが低分子量試薬であるので、グラフト化されたDex鎖の立体障害による影響とは考えにくい。従つて、グラフト化されたDex鎖による、PLL骨格のまわりの誘電率のような微環境の要因の変化に起因する可能性がある。

【0040】

UV融解曲線測定

以下のUV融解曲線カーブ測定に使用されたODNのヌクレオチド配列は、以下のとおりである；ODN1: 5' -TCC TCG CCC TTG CTC ACC AT- 3' , ODN2: 5' -ATG GTG AGC AAG GGC GAG GA-3'。DNA二重鎖は等モル量のODN1及びODN2を混合し、95°Cで5分間アニーリングし、その後、16時間以上かけてゆっくりと室温まで冷却することによって調製した。他の溶剤および試薬等級の化学薬品は、和光純薬工業株式会社(大阪(日本))から購入し、それ以上の精製なしで使用した。

【0041】

緩衝液I(150mM NaCl および0.5mM EDTAを含んでいる10mM PBS(pH 7.2))にヌクレオチドを溶解ことにより保存液を調製した。原液の濃度は、260nmにおけるモル吸光係数を使用して計算された($1.65 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (ODN1)、及び $2.11 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (ODN2))。UV融解曲線測定用溶液は、保存ヌクレオチド溶液(最終濃度27.8 μM)を緩衝液Iで希釈することにより調製された。希釈したヌクレオチド溶液の混合物を90°Cで5分間加熱し、徐々に冷却し、その後、16時間室温で放置した。共重合体の原液も様々な濃度になるように緩衝液Iで希釈した。ヌクレオチドと共に重合体の希釈溶液は、様々なN/P比率([アミノ基]共重合体/[リン酸基]DNA)となるようにマイクロピペットで混合した。

【0042】

UVスペクトルおよびUV融解曲線は、TMSPC-8温度調節器(島津製作所(株)京都(日本))を装備したShimadzu UV-1600 PC分光計で記録された。UV融解曲線は加熱速度として1 K/minで記録された。示差吸光度($\Delta A = A_{260} - A_{340}$)は基線シフトを修正する為に計算した。と意図された。一次微分 [$d(\Delta A)/dT$] は融解曲線データから計算された。派微分曲線中のピーク温度を融解温度(T_m)として定義した。

【0043】

DNA/共重合体相互作用に対するグアニジン化の影響

DNA二重鎖の融解分析によって、DNA/共重合体相互作用に対するグアニジン化の影響を解明した。図5は、0(DNAのみ)~10に及ぶ様々なN/P比率における、くし型共重合体の不存在又は存在下での20bp dsDNAのUV融解曲線および T_m 値を示す。DNA単独では、生理学的イオン強度(10mM PBS-150 mM NaCl)において70.3°Cで二重らせんから一本鎖への転移が見られた。PLL-g-DexあるいはGPLL-g-Dexのいずれかが存在する状態で、dsDNAの T_m の増加が観察された。 T_m の増加はN/P比率2でプラトーへ達した後、N/P比率10まで一定のままである(図5 b)。PLL-g-Dexは T_m を15°C増加させたが、GPLL-g-Dexは5°Cしか増加させなかつた。くし型共重合体は主としてDNA鎖の中の静電気斥力を抑えることにより二重鎖及び三重鎖DNAを安定化していると考えられる(A. Maruyama, M. Katoh, T. Ishihara and T. Akaike, Bioconjugate Chem. 8, 3 (1997)、A. Maruyama, H. Watanabe, A. Ferdous, M. Katoh, T. Ishihara and T. Akaike, Bioconjugate Chem. 9, 292 (1998)、及び、A. Maruyama, Y-I. Ohnishi, H. Watanabe, H. Torigoe, A. Ferdous and T. Akaike, Colloids Surf. B 16, 273 (1999))。従って、図5の結果から、dsDNAへのGPLL-g-Dexのイオンの親和力がPLL-g-Dexより弱いものと考えられる。

【0044】

そこで、次に、 T_m 測定(図6)によってDNAに対する共重合体の親和力を評価した。PLL-g-Dex及びGPLL-g-Dexの溶解液を、所定のN/P比率となるようにDNA溶液と一緒に入れた。PLL-g-DexのN/P比率を2、4及び8に調節し、一方、GPLL-g-DexのN/P比率は2で維持した。PLL-g-Dexが過剰濃度(GPLL-g-Dexの4倍まで、図6 b)で存在するにもかかわらず、GPLL-g-Dexの存在下で T_m は殆ど増加しなかったことは注目されるべきである。これらの結果は、dsDNAとGPLL-g-Dexとの選択性的な相互作用を示しており、dsDNAに対するGPLL-g-Dexの親和力がPLL-g-Dexよりもかなり高いことを意味するものである。

【0045】

上記の結果は、dsDNAの安定性がdsDNAに対する親和性によってだけでなく、その他のモードの相互作用による影響を受ける可能性を示唆する。オリゴアルギニンがオリゴリジンよりもDNAに対する親和性が強いことが報告された。オリゴアルギニンとオリゴリジンの両方は、主にイオン相互作用によってDNAと相互作用する。しかしながら、水素結合相互作用は、オリゴアルギニンとDNAとの間の強い相互作用に寄与する(D. P. Mascotti and T. M. Lohman, Biochemistry 36, 7272 (1997))。同様に、PLL-g-Dexより強いGPLL-g-Dexの親和力は、グアノジノ基とDNAとの間の水素結合相互作用に起因するかもしれない。共重合体とDNAの間の水素結合の関与は、dsDNAに対するGPLL-g-Dexのより弱い安定効果を引き起こすかもしれない。これらの知見は、ジペプチドArg-Glu内のアルギニンは、单鎖DNA内のシトシン、並びに单鎖及び二重鎖DNA内のグアノシンと同様に、核酸リン酸塩と水素結合を成形することができる、という従来の研究と一致している(G. Lancelot, R. Mayer and C. Helene, Biochim.

Biophys. Acta 564, 181 (1979))。

【0046】

鎖交換反応の解析

以下の鎖交換反応の解析実験に使用されたODNの塩基配列は、以下の通りである；ODN1 (5

- TCC TCG CCC TTG CTC ACC AT -3') 、ODN2 (5' -

ATG GTG AGC AAG GGC GAG GA

- 3') 、ODN3 (5' - ATG GTG

AGC AAG GGC GAG GA - 3'-(FITC))。DNA二重鎖の溶液では等モル量のODN1及びODN3を混合し、95℃で5分間アニーリングし、その後、16時間以上かけてゆっくりと室温まで冷却することによって調製した。DNA単鎖の溶液ではODN2を試料した。他の溶剤および試薬等級の化学薬品は、和光純薬工業株式会社（大阪（日本））から購入し、それ以上の精製なしで使用した。

【0047】

緩衝液I（150mM NaClを含んでいる10mM PBS（pH 7.2））にODNを溶解することにより保存ODN溶液を調製した。この濃度は、260nmにおけるモル吸光係数に基づいて計算した。 $(1.65 \times 10^5 M^{-1} cm^{-1}$ (ODN1)、及び $2.11 \times 10^5 M^{-1} cm^{-1}$ (ODN2、ODN3)) 共重合体であるPLL-g-Dex及びGPLL-g-Dexの原液も緩衝液Iで溶解することにより調製した。この濃度は、平均分子量に基づいて計算した。

【0048】

鎖交換反応における速度解析用溶液は、これらの保存溶液を緩衝液Iで希釈することにより、目的とする濃度に調節した。

最初に、DNA二重鎖の溶液と共重合体の溶液を、N/P=2となるように混合した。次にDNA単鎖の溶液を加えて鎖交換反応を開始した。（最終濃度：DNA二重鎖 $0.5 \mu M$ 、交換用单鎖 $2.5 \mu M$ ） 反応温度は15℃とした。

目的とする反応時間（～6時間）に達したときに、ODNと共重合体の相互作用を打ち消して鎖交換反応を停止させるために、過剰量のSalmon sperm DNAを加えた。

ゲル電気泳動においては、泳動用ゲルとして13% ポリアクリロアミドゲルと、泳動バッファーとしてTBE緩衝液（トリス-ホウ酸緩衝液にEDTAを添付した試薬）を用いた。この泳動用ゲルにODN試料をセットした後に、泳動条件を室温で1時間、電圧は100Vに設定して実施した。

【0049】

泳動終了後はFITCによる蛍光バンドにより、ODN3の二重鎖状態と単鎖状態の存在を示す泳動ゲルを得た。この二重鎖状態から単鎖状態への移行が、鎖交換反応の進行度合を示している。

この泳動ゲルを映像化（図7）して、蛍光バンドの存在比を定量化するために、LAS-3000 蛍光写真分析装置（富士写真フィルム（株）神奈川（日本））を使用した。そして、この蛍光バンドの存在比を鎖交換率とした。（図8）

この結果、PLL-g-DexとGPLL-g-Dexの鎖交換反応に与える影響の差違が観測された。明確にGPLL-g-Dexの方がPLL-g-Dexより交換速度を高めることが確認された。

【0050】

ポリイオン複合体形成の解析

以下のポリイオン複合体(IPECs: InterPolyElectrolyte

Complexes)形成の解析実験に使用されたODNの塩基配列は、以下の通りである；ODN1 (5' - TCC TCG CCC TTG CTC ACC AT -3') 、ODN3 (5' - ATG GTG AGC AAG GGC GAG GA - 3'-(FITC))。DNA二重鎖の溶液では等モル量のODN1及びODN3を混合し、95℃で5分間アニーリングし、その後、16時間以上かけてゆっくりと室温まで冷却することによって調製した。DNA単鎖の溶液ではODN3を試料した。他の溶剤および試薬等級の化学薬品は、和光純薬工業株式会社（大阪（日本））から購入し、それ以上の精製なしで使用した。

緩衝液I（150mM NaClを含んでいる10mM PBS（pH

7.2））にODNを溶解することにより保存ODN溶液を調製した。この濃度は、260nmにおける

モル吸光係数に基づいて計算した。 $(1.65 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (ODN1)、及び $2.11 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (ODN3)) 共重合体であるPLL-g-Dex及びGPLL-g-Dexの原液も緩衝液Iで溶解することにより調製した。この濃度は、平均分子量に基づいて計算された。

【0051】

IPECs形成の解析用溶液は、これらの保存溶液を緩衝液Iで希釈することにより、目的とする濃度に調節した。

目的とするN/P比(0.0~2.0)となるように、共重合体の溶液に対してDNA二重鎖(最終濃度： $0.5 \mu \text{M}$)とDNA単鎖(最終濃度： $1.0 \mu \text{M}$)の混合溶液を加えた。そして室温で1時間反応させてIPECsを形成させた。

ゲル電気泳動においては、泳動用ゲルとして13%ポリアクリロアミドゲルと、泳動バッファーとしてTBE緩衝液(トリス-ホウ酸緩衝液にEDTAを添付した試薬)を用いた。この泳動用ゲルにODN試料をセットした後に、泳動条件を室温で1時間、電圧は100Vに設定して実行した。

【0052】

泳動終了後はFITCによる蛍光バンドにより、遊離のODN3の存在を示す泳動ゲルを得た。この二重鎖状態及び単鎖状態の双方における蛍光バンドの消失が、IPECs形成の度合を示している。

この泳動ゲルの映像化(図9)するために、LAS-3000蛍光写真分析装置(富士写真フィルム(株)神奈川(日本))を使用した。

この結果、PLL-g-DexとGPLL-g-DexのODNに対するポリイオン複合体の形成能の差違が観測された。両方ともDNA二重鎖に対しては、N/P比が1以上では完全に複合体を形成しており顕著な差違は観測されなかった。

しかし、DNA単鎖に対しては、明確にGPLL-g-Dexの方がPLL-g-Dexより結合能が強いことを確認した。

【産業上の利用可能性】

【0053】

本発明の調製物は、遺伝子解析(SNPs解析、DNAチップ、PCR等)、核酸を利用したナノ組織体、分子マシーン、核酸医薬などの分野で幅広く利用することが出来る。

【図面の簡単な説明】

【0054】

【図1】PLL-g-Dexのグアニジン化反応における ^1H NMRスペクトルの時間経緯による変化を示すチャートである。

【図2】精製後に得られた共重合体(GPLL-g-Dex)の ^{13}C NMRスペクトルを示す。

【図3】GPLL-g-DexとPLL-g-DexのSec-MALSによる測定結果を示す。

【図4】PLL-g-Dex共重合体およびPLLホモポリマー($M_n=27,600$)のグアニジン化の時間経緯による変化を示す。

【図5】様々なN/P比率における、くし型共重合体の不存在又は存在下での20bp dsDNAのUV融解曲線およびTm値を示す。

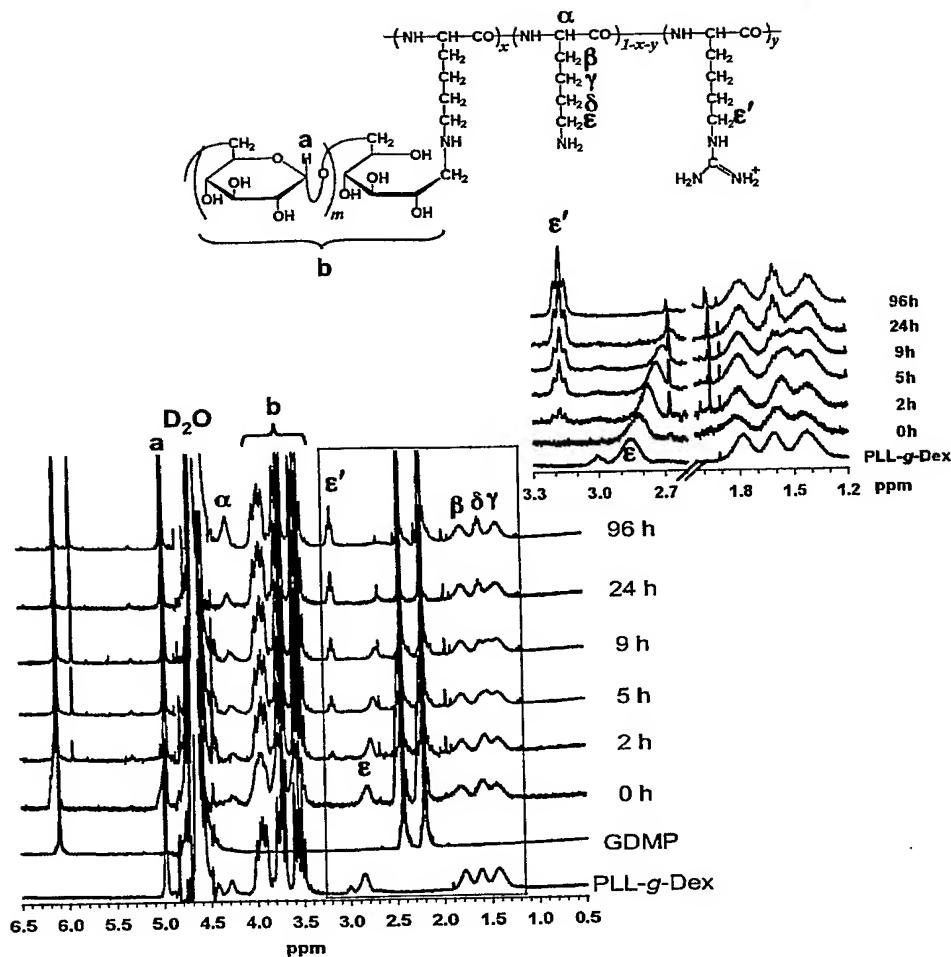
【図6】DNAに対する共重合体の親和力をTm測定した結果を示す。

【図7】鎖交換反応の進行度合を示している泳動ゲルを映像化した写真である。

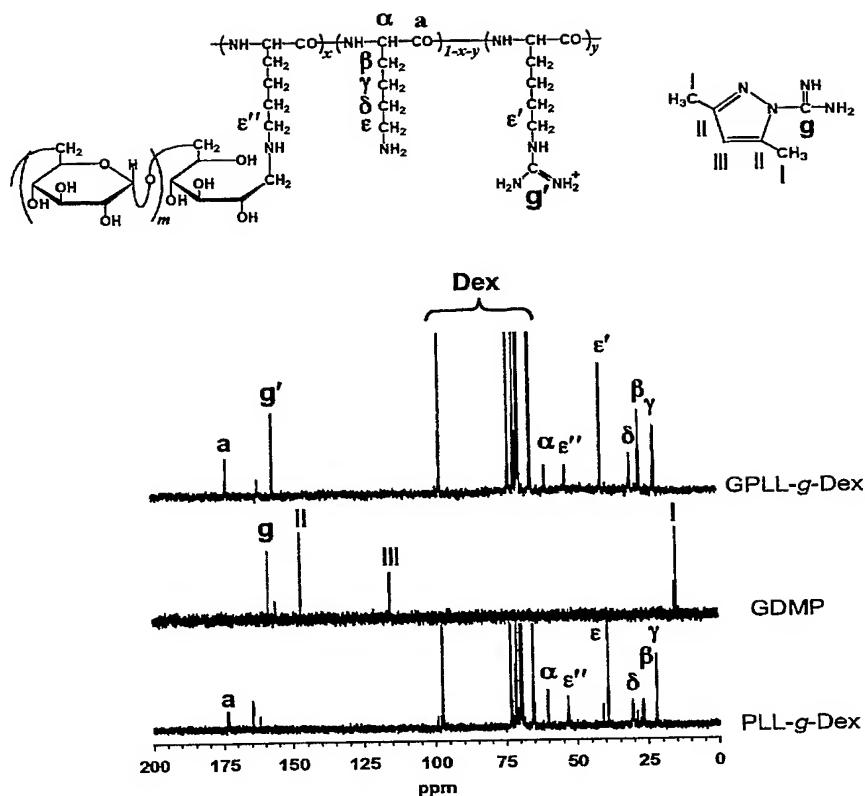
【図8】鎖交換反応の進行度合を示すグラフである。

【図9】PLL-g-DexとGPLL-g-DexのODNに対するポリイオン複合体の形成能を示す泳動ゲルの写真である。

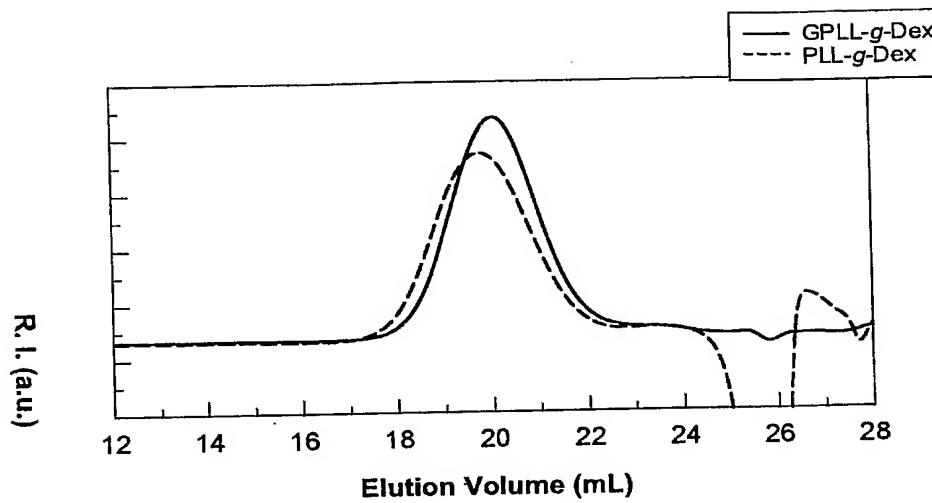
【書類名】図面
【図 1】



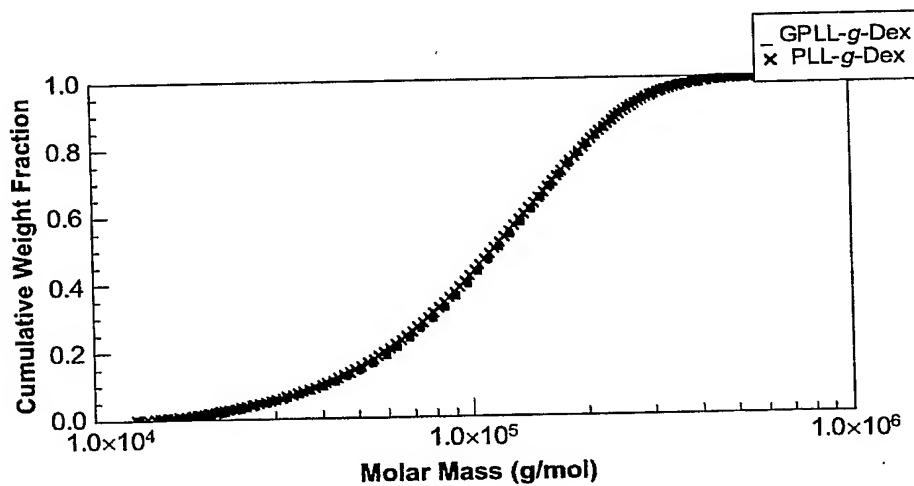
【図2】



【図3】

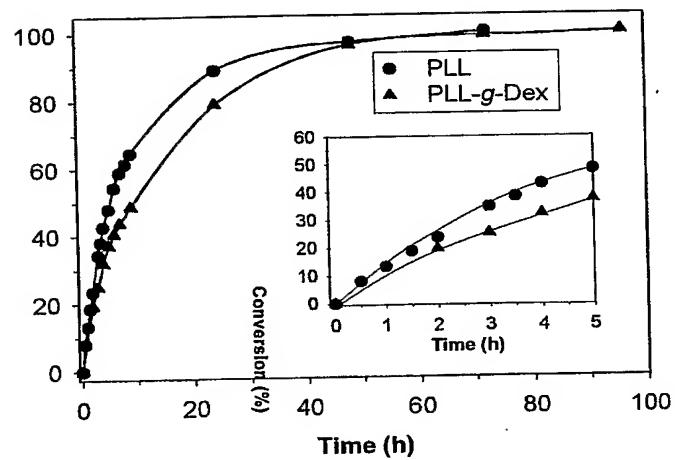


(a)

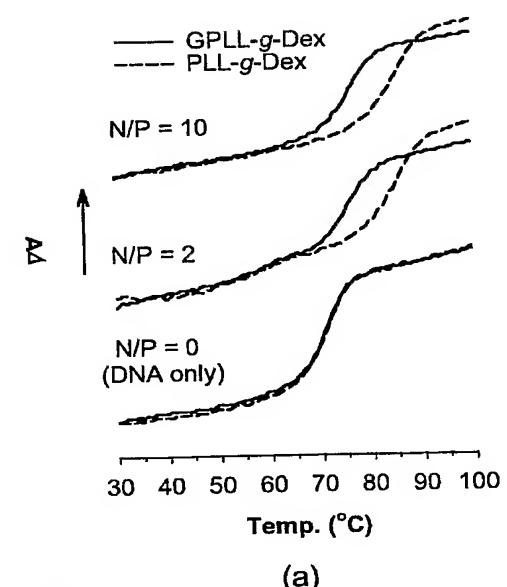


(b)

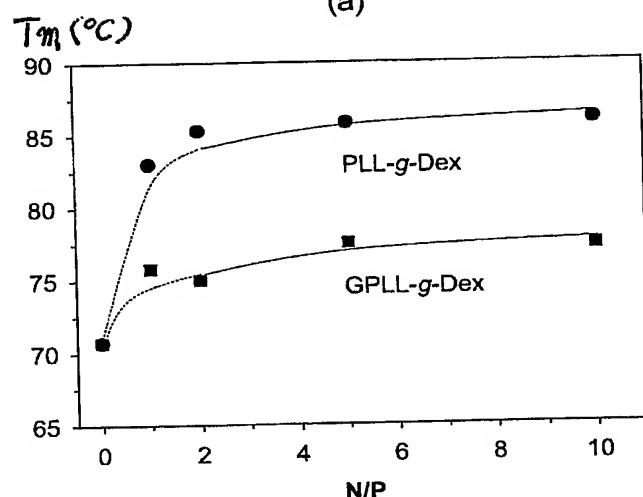
【図4】



【図 5】

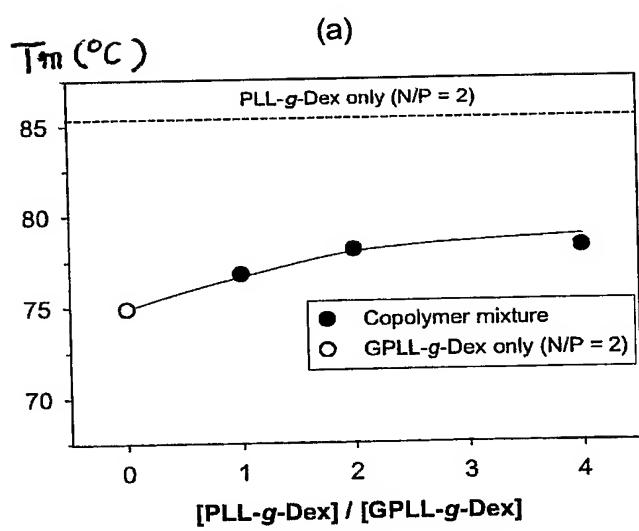
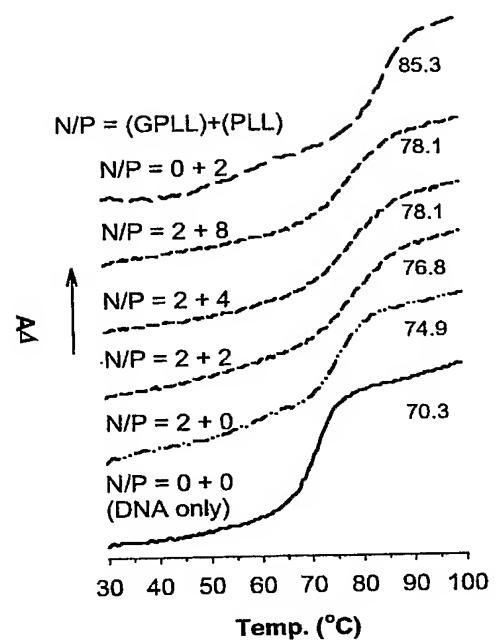


(a)

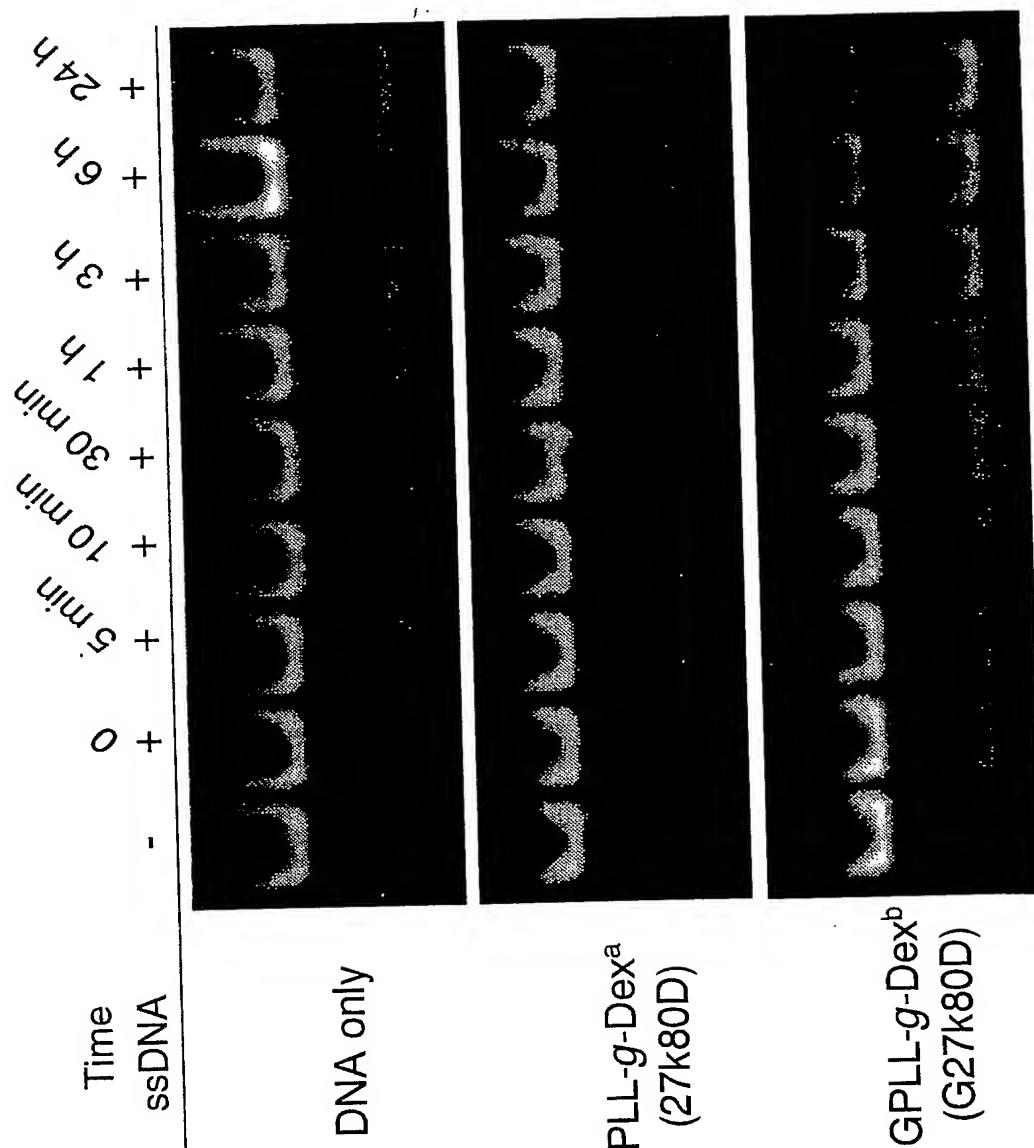


(b)

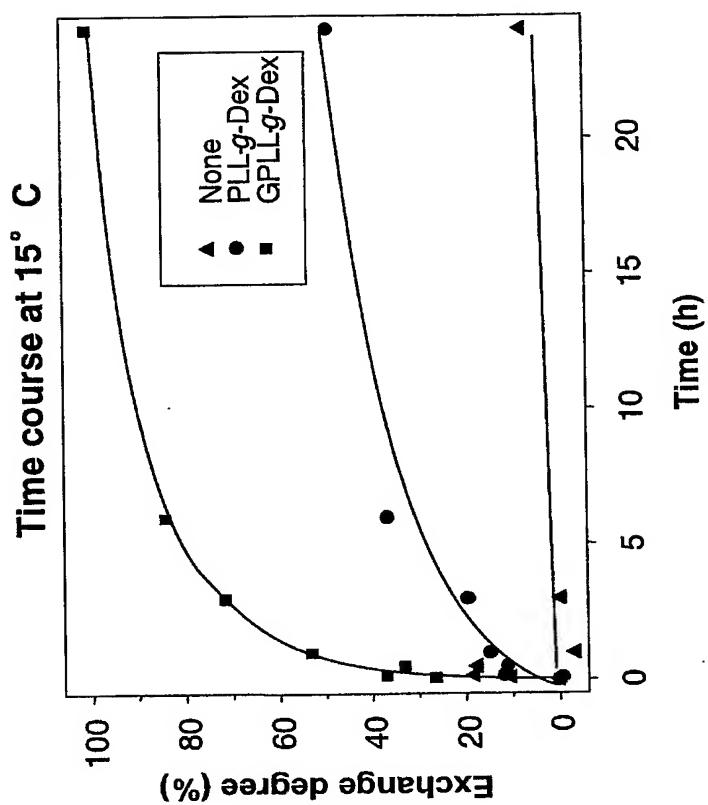
【図6】



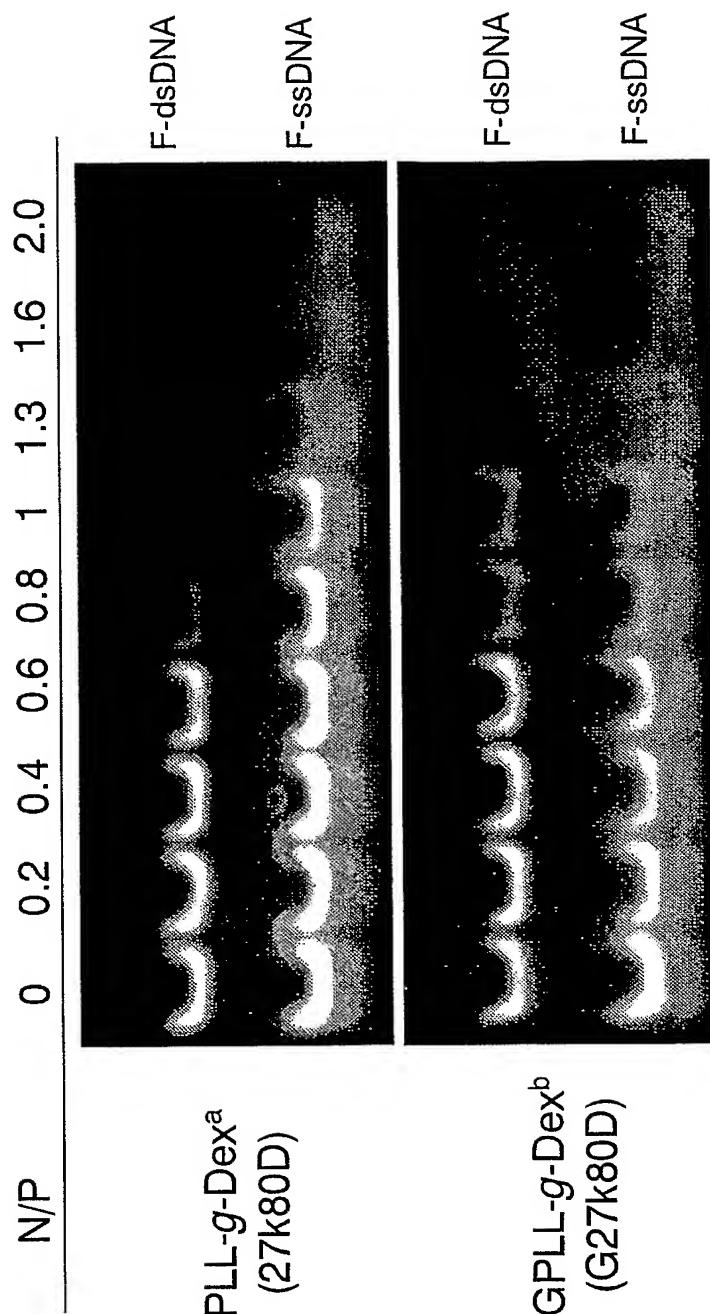
【図 7】



【図 8】



【図9】



【書類名】要約書

【要約】

【課題】従来のコポリマーに比べて、数十倍～数百倍の交換反応促進活性を有する物質を提供すること。

【解決手段】グアニジノ基を含む主鎖と、親水性官能基からなるカチオン性高分子を有効成分とする、二重鎖DNA又はRNAにおける特定部位のヌクレオチド配列の該配列に相同的のヌクレオチド配列による交換反応を促進するための調製物に係る。これは、従来のコポリマーに比べて、数十倍～数百倍の交換反応促進活性を有する物質を提供することが出来、その結果、従来に比べ、より低温及び／又は高速にヌクレオチド鎖交換を行うことができる。

【選択図】 図5

認定・付加情報

特許出願の番号	特願2004-058336
受付番号	50400343365
書類名	特許願
担当官	第七担当上席
作成日	0096 平成16年 4月16日

<認定情報・付加情報>

【提出日】	平成16年 3月 3日
-------	-------------

特願 2004-058336

ページ： 1/E

出願人履歴情報

識別番号

[503360115]

1. 変更年月日

[変更理由]

住 所

氏 名

2003年10月 1日

新規登録

埼玉県川口市本町4丁目1番8号

独立行政法人 科学技術振興機構